



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

NATHÁLIA MODESTO XAVIER DE ARAÚJO

**PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS CEPAS DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii* COLETADAS EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM JOÃO PESSOA - PB**

JOÃO PESSOA – PB

2018

NATHÁLIA MODESTO XAVIER DE ARAÚJO

**PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS CEPAS DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii* COLETADAS EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM JOÃO PESSOA - PB**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
curso de Farmácia, do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para a obtenção do Grau
de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADOR:

Prof^o. Dr^o. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra

JOÃO PESSOA - PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663p Araujo, Nathalia Modesto Xavier de.

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS CEPAS DO
COMPLEXO *Sporothrix schenckii* COLETADAS EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO EM JOÃO PESSOA - PB / Nathalia Modesto
Xavier de Araujo. - João Pessoa, 2018.

51 f.

Orientação: Felipe Queiroga Sarmiento Guerra.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Esporotricose. 2. susceptibilidade antifúngica. 3.
sporothrix schenckii. I. Guerra, Felipe Queiroga
Sarmiento. II. Título.

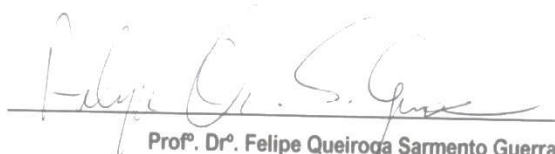
UFPB/BC

NATHÁLIA MODESTO XAVIER DE ARAÚJO

**PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DAS CEPAS
DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii* COLETADAS EM UM
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EM JOÃO PESSOA - PB**

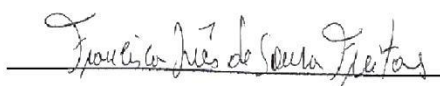
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do
Curso de Farmácia, do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade
Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 31 de Outubro de 2018.



Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmiento Guerra

(Departamento de Ciências Farmacêuticas / CSS / UFPB)



Profa. Dra. Francisca Inês de Sousa Freitas

(Departamento de Ciências Farmacêuticas / CSS / UFPB)



(Farmacêutico Dr. Júlio Abrantes Pereira / AVALIADOR INTERNO -
DCF/CCS/UFPB)

Dedico este trabalho à minha fonte inesgotável de amor, minha amada mãe Fátima Xavier, por todo incentivo, carinho e dedicação!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao autor da minha história (o meu Deus), que permitiu que eu chegasse até aqui, a Ele toda honra e toda glória.

A minha amada mãe, Fátima Xavier, por todo apoio, carinho e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis dessa trajetória tão árdua. Sem a sabedoria das suas palavras de encorajamento eu não teria obtido forças para prosseguir. Obrigada por nunca medir esforços para investir na minha educação. Posso dizer com toda certeza que não teria chegado aqui sem seu apoio e amor incondicional!

A minha querida irmã Nyhédia, que mesmo distante sempre me apoiou e encorajou a lutar pelos meus objetivos! Sou muito grata a Deus por tê-la em minha vida!

Aos meus familiares que acompanharam minha luta diária e sempre torceram por mim! Obrigada por todo apoio, especialmente ao meu primo Lucas, que sempre me ajudou nos momentos em que eu mais precisei.

Minha eterna gratidão a minha amada avó Tereza (*in memoriam*) e a minha tia Lourdes (*in memoriam*), que mesmo não estando mais aqui para celebrar comigo essa conquista, sempre me encorajaram a acreditar nos meus sonhos e a lutar para que eles se tornassem reais.

A cada um que contribuiu para que essa caminhada se tornasse mais leve! Alguns me acompanharam desde o início desta trajetória, outros foram se aproximando no decorrer da caminhada, mas cada um teve a sua singularidade e é especial para mim! Agradeço a Gabriela Keyla, por seu companheirismo e valiosa amizade desde os primeiros dias da graduação até aqui! Aos queridos amigos do grupo “Saidinhas” Jéssica Ferreira, Glaice Rayane, Leonardo Santos, Rayane Maria, Sabine Helena e César Carneiro. Obrigada por fazerem meus dias na UFPB serem mais alegres! Foi muito bom compartilhar com vocês não só os momentos de estudos, mas os momentos de descontração também! Agradeço a todos pela força, cumplicidade e companheirismo ao longo desses anos, especialmente a minha amiga e conterrânea Jéssica Ferreira, por toda ajuda nos experimentos deste trabalho e por sua amizade preciosa.

Ao meu namorado e companheiro de jornada Berg Diniz, por todo amor, carinho, compreensão e paciência, especialmente nessa reta final! Obrigada por não medir esforços para me ajudar sempre que eu precisei e por sua amizade de valor imensurável.

Ao meu orientador, Prof^o Dr^o Felipe Guerra, por todo suporte na elaboração deste trabalho, por sua atenção, paciência, dedicação e confiança! Obrigada também por todas as vezes que se disponibilizou a ir para a bancada do laboratório me ajudar nos experimentos, e por ter sido sempre um orientador acessível e disposto a ajudar.

À Prof^a Dr^a Zélia Braz, e a toda equipe do Laboratório de Micologia do DCF por todo apoio, espaço e material cedidos para a realização desta pesquisa, como também a toda equipe do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico e Analítico, pelos equipamentos cedidos para a realização deste trabalho.

A minha banca examinadora, Prof^a Dr^a Francisca Inês e ao Dr^o Júlio Abrantes, por aceitarem o convite e pelas ricas contribuições.

Aos meus mestres, por toda dedicação e conhecimentos repassados no decorrer desta caminhada.

A todos vocês meu muito obrigada!

Nunca desistir... “...porque sei em quem eu tenho colocado a minha fé e estou certo de que Ele é poderoso para guardar aquilo que me confiou, até que aquele dia chegue”. (2 Timóteo 1:12)

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea, causada pelos fungos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, que acometem tanto o homem quanto animais. Estudos sobre o perfil de sensibilidade antifúngica das espécies pertencentes a este complexo, ainda são escassos, apesar do número de casos de esporotricose aumentarem exponencialmente a cada ano. Conhecer as espécies mais prevalentes de cada região, e submetê-las a testes de sensibilidade antifúngica é de grande importância para garantir ao paciente, um tratamento eficaz, através do uso dos antifúngicos adequados. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos anfotericina B, voriconazol, fluconazol e itraconazol, de 24 cepas do complexo *Sporothrix*, provenientes de um trabalho de caracterização fenotípica, realizado por FERREIRA, J. S., cujas cepas foram coletadas de pacientes atendidos em um Hospital Universitário, no município de João pessoa - PB. A atividade antifúngica dos fármacos testados foi avaliada pelo método de microdiluição, conforme procedimentos relatados na CLSI M38. De forma geral, o voriconazol foi o fármaco mais ativo, seguido pela anfotericina B, enquanto o itraconazol apresentou menor atividade e o fluconazol não apresentou atividade a nenhuma das cepas testadas. Três isolados apresentaram resistência ao itraconazol, sendo um *S. schenckii* e dois *S. brasiliensis*. Dois isolados apresentaram resistência tanto ao itraconazol quanto a anfotericina B, sendo um isolado *S. schenckii* e um *S. brasiliensis*. O presente estudo constatou diferenças de suscetibilidade aos antifúngicos entre as espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii*.

Palavras-chave: Esporotricose; suceptibilidade antifúngica; *sporothrix schenckii*.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis, responsible for fungi belonging to the *Sporothrix schenckii* complex, which affects both human and animals. Studies on the antifungal sensitivity profile of species belonging to this group are still scarce, although the number of cases of sporotrichosis increased exponentially each year. It is important to know the most prevalent species in each region, and submit them to antifungal sensitivity tests for an effective treatment through the use of appropriate antifungal agents. Thus, this study aims to evaluate the profile of sensitivity to the antifungal agents amphotericin B, voriconazole, fluconazole and itraconazole, from 24 strains of the *Sporothrix* complex, from a phenotypic characterization study by FERREIRA, JS, whose strains were collected from patients attended at a University Hospital, in the city of João Pessoa - PB. The antifungal activity of the tested drugs was evaluated by the microdilution method, according to procedures reported in CLSI M38. In general, voriconazole was more active followed by amphotericin B, whereas itraconazole showed less activity and fluconazole was not active in any of the strains tested. Three isolates showed resistance to itraconazole, one *S. schenckii* and two *S. brasiliensis*. Two isolates showed resistance to both itraconazole and amphotericin B, one isolate *S. schenckii* and one *S. brasiliensis*. This study found differences in antifungal sensitivity between the *S. brasiliensis* and *S. schenckii* species.

Key Words: Sporotrichosis; antifungal susceptibility; *Sporothrix schenckii*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Morfologia de <i>Sporothrix spp.</i> (A):Colônia filamentosa; (B): Colônias.....	17
FIGURA 2 - (A): Microcultivo da forma filamentosa; (B): Microscopia de células leveduriformes.....	18
FIGURA 3 - Três tipos distintos de melanina produzidos por <i>Sporothrix spp.</i> A) melanina DHN; B) eumelanina; C) piomelanina.....	20
FIGURA 4 - Prevalência mundial de esporotricose humana evidenciando a ampla distribuição da micose.....	22
FIGURA 5 - Forma cutânea fixa da esporotricose.....	24
FIGURA 6 - Forma linfocutânea da esporotricose	25
FIGURA 7 - Esporotricose cutânea disseminada.....	25
FIGURA 8 - Esporotricose pulmonar.....	26

LISTA DE QUADROS E TABELA

QUADRO 1 - Principais diferenças morfológicas entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.....**30**

QUADRO 2 - Identificação das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.
.....**34**

TABELA 1 - Média das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos
antifúngicos
testados.....**39**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF. B – Anfotericina B

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

BHI - *Brain Heart Infusion* (Ágar Cérebro e Coração)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *The Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMA – *Corn Meal Agar*

CNS - Conselho Nacional de Saúde

DMSO - Dimetilsulfóxido

EBSERH - Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

FLC - Fluconazol

GMS - *Grocott-Gomori*

HULW - Hospital Universitário Lauro Wanderley

ITZ - Itraconazol

KOH - Hidróxido de Potássio

mg – miligramas

µL – microgramas

mL – mililitros

MS - Ministério da Saúde

PAS - *Periodic acid-Schiff*

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SM – Setor de micologia

TCLE - Termo de Consentimento Livre e esclarecido

UFC - Unidade Formadora de Colônia

ULAC/HU - Unidade Laboratório de Análises Clínicas/ Hospital Universitário

VRC - Voriconazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 HISTÓRICO	15
2.2 TAXONOMIA E MORFOLOGIA	16
2.3 PRINCIPAIS FATORES DE VIRULÊNCIA	18
2.4 EPIDEMIOLOGIA	20
2.5 FISIOPATOGENIA	23
2.6 ASPECTOS CLÍNICOS	23
2.6.1 FORMA CUTÂNEA FIXA	23
2.6.2 FORMA LINFOCUTÂNEA	24
2.6.3 FORMA CUTÂNEA DISSEMINADA	25
2.6.4 FORMA EXTRACUTÂNEA	26
2.7 DIAGNÓSTICO	27
2.7.1 EXAME DIRETO	27
2.7.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO	27
2.7.3 EXAME SOROLÓGICO	27
2.7.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	28
2.7.5 CULTURA	29
2.7.6 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	29
2.8 TRATAMENTO	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	33
4.2 LOCAL DO ESTUDO	33
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	33
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	33
4.5 POPULAÇÃO E AMOSTRA	33
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	35
4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	35

4.7.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO -----	35
4.7.2 PREPARAÇÃO DOS ANTIFÚNGICOS -----	36
4.7.3 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA CIM -CLSI M38A -----	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	38
6 CONCLUSÃO -----	43
REFERÊNCIAS -----	44

1 INTRODUÇÃO

Os fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, são seres dimórficos, têm distribuição cosmopolita, e estão presentes em solos ricos em matéria orgânica. Esses fungos são agentes etiológicos da esporotricose, uma micose subcutânea que pode acometer humanos e animais, através da inoculação de estruturas fúngicas, após traumas na pele. As espécies pertencentes a este complexo são: *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. lurie* e *S. schenckii*. (LOPES-BEZERRA, 2018).

Essa micose era associada principalmente às atividades ocupacionais, especialmente por profissionais que lidam diretamente com a terra como floristas e jardineiros, que podem adquirir a infecção através de traumas na pele com material contaminado pelo fungo. (CRUZ, 2013). No entanto, esse perfil tem mudado devido ao aumento do número de casos zoonóticos, nos quais a transmissão da esporotricose tem ocorrido principalmente através da arranhadura ou mordedura de animais domésticos infectados, especialmente felinos. (BARROS, 2011).

A esporotricose apresenta diferentes formas clínicas, sendo as formas de acometimento da pele e vasos linfáticos, (cutânea-fixa e linfocutânea) mais comuns que o acometimento extracutâneo. Na forma cutânea-fixa, as lesões ulceradas ficam restritas ao local de inoculação, enquanto que na forma linfocutânea há formação de nódulos linfáticos. Apesar de incomuns, as manifestações extracutâneas são preocupantes, uma vez que são de diagnóstico difícil, apresentam prognóstico desfavorável e quase sempre estão associadas a pacientes imunocomprometidos. (FREITAS; 2014; BONIFAZ, 2017).

A escolha dos medicamentos usados na farmacoterapia da esporotricose, é feita de acordo com a clínica do paciente e entre os principais fármacos utilizados estão: iodeto de potássio, terbefina, itraconazol para as formas cutâneas e anfotericinaB. (OROFINO-COSTA et al., 2017).

As terapias dessas infecções têm enfrentado uma problemática devido ao aumento do aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos empregados no tratamento dessa micose. (PEREIRA et al., 2009). Um estudo de susceptibilidade realizado pelo Departamento de Biologia e Ciências Ambientais da Universidade de Messina, na Itália, mostrou que todas as espécies de *S. schenckii* testadas foram resistentes ao fluconazol. (SCORDINO et al., 2015).

A identificação das espécies não é realizada na rotina laboratorial, especialmente na região Nordeste, muito em função da baixa especificidade dos testes fenotípicos empregados e alto custo dos métodos moleculares. Sendo feito apenas a identificação do gênero fúngico. Logo dificultando o conhecimento acerca das espécies mais prevalentes da nossa região, consequentemente seus respectivos perfis de sensibilidade aos antifúngicos utilizados no tratamento.

Assim, a importância do conhecimento dos perfis de sensibilidade de determinadas espécies ajudará em um melhor entendimento de quais antifúngicos devem ser utilizados para o perfil microbiano de uma determinada região, incentivando a realização de tal pesquisa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Em 1896, nos Estados Unidos, o médico Benjamin Schenckii isolou do abscesso de um paciente, o que dois anos depois viria a ser classificado como *Sporothrix Schenckii*. (SCHENCK, 1898). O paciente do qual Benjamin Schenck isolou o *S. schenckii* se tratava de um paciente do sexo masculino, de 36 anos, com lesões de acometimento de cadeia linfática. Benjamin, após isolar o agente das lesões, descreveu a morfologia e cultura do micro-organismo isolado. A amostra foi enviada para Erwin F. Smith, micologista do Departamento de Agricultura dos EUA, que classificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporotrichum*. (ABREU, 2017; SCHENCKII 1898).

O segundo caso de esporotricose que também aconteceu nos Estados Unidos, foi relatado em 1900 por Hektoen e Perkins. Foi o caso de uma criança do sexo masculino, de 5 anos de idade, que sofreu uma lesão na mão ao manusear um martelo. A lesão acompanhou a cadeia linfática do braço, com nódulos ulcerados e não ulcerados. Nesse episódio o agente recebeu a nomenclatura atualmente utilizada, *Sporothrix schenckii*. (CRUZ, 2013)

Os primeiros casos de esporotricose no Brasil, foram citados no ano de 1907 por Adolpho Lutz e Affonso Splendore, em um trabalho apresentado em um congresso de Medicina e posteriormente publicado na Revista Médica de São Paulo. (VERMA et al.; 2012). Outros casos de forma isolada surgiram desde então, até que no final da década de 90 o estado do Rio de Janeiro enfrentou uma grande epidemia, e há alguns anos a doença se tornou um problema de saúde pública. (SILVA, COSTA e TORRES et al.; 2012).

Já os primeiros relatos documentados envolvendo a infecção de felinos em território nacional ocorreram apenas na década de 50. Em 1983, houve a primeira descrição da esporotricose felina realizada por Cruz e colaboradores, no estado do Rio de Janeiro, evidenciando a enfermidade em dois felinos da região serrana. A epidemia de esporotricose felina no referido estado, teve início em áreas de baixo status socioeconômico e alta densidade demográfica. (LOPES-BEZERRA, 2018).

Nas primeiras décadas do século XX, a esporotricose era predominante nos EUA e França, com alguns casos registrados em outros países da Europa, América do Sul e Rússia. Desde então, surtos desta micose foram documentados em outros países como África do Sul, Austrália e China. (Freitas, 2014). Entre 2007 e 2009 foram registrados 457 casos de esporotricose no Nordeste da China, onde a doença já é considerada endêmica. (OROFINO, 2018).

No Brasil, tem uma incidência significativa no estado do Rio de Janeiro, onde até o final da década de 90 diagnosticava-se três casos anualmente em humanos, e no ano de 2000 houve um salto para 43 casos humanos diagnosticados, desde então a quantidade de ocorrências em humanos e animais vem crescendo exponencialmente (BARROS et al., 2010)

2.2 Taxonomia e morfologia

A taxonomia é uma ciência dinâmica que está associada com a síntese de informações obtidas da bioquímica, biologia celular, genética morfologia e fisiologia. Critérios taxonômicos como a morfologia celular, o modo de brotamento, a presença e o tipo de ciclo sexual e os esporos, ainda são imprescindíveis para a identificação das espécies fúngicas, e dessa forma o estabelecimento do diagnóstico das infecções. Os métodos utilizados são baseados na detecção do patógeno no tecido através do exame microscópico direto, seu isolamento e identificação em cultura; e a detecção de uma resposta imunológica ao patógeno (RODRIGUES, 2010).

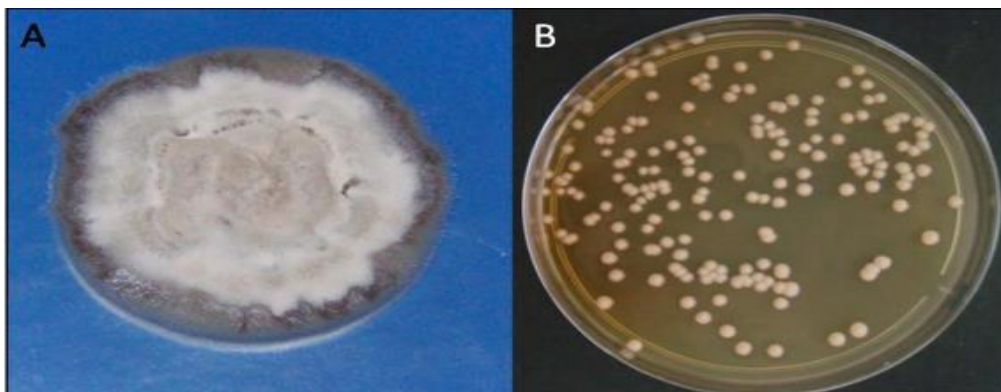
De acordo com a classificação taxonômica, o *Sporothrix spp.* está inserido no reino Fungi, divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Ophiostomatales, família Ophiostomataceae, gênero *Sporothrix*. (FREITAS, 2014). As espécies *S. schenckii*; *S. brasiliensis*; *S. globosa*; *S. albicans*; *S. luriei* compõem atualmente as espécies consideradas patogênicas do gênero *Sporothrix*. (LOPES-BEZERRA, 2018).

A descoberta de novas espécies foi possível graças às técnicas de encadeamento de genomas, estudos de taxonomia polifásica, reações de polimerase em cadeia, análise de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. (CRUZ, 2013).

Os fungos pertencentes ao complexo *S. schenckii* apresentam-se na natureza, ou em cultura *in vitro* à temperatura ambiente como um fungo filamentososo, enquanto que no tecido do hospedeiro ou em cultura *in vitro* a 37°C existe como levedura. (ABREU, 2017). Fatores como pH e tensão de dióxido de carbono também estão relacionados com o dimorfismo desses micro-organismos. (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Quando cultivados à temperatura de 25°C, as colônias desse fungo apresentam coloração inicialmente creme, tornando-se marrom escuras com o tempo, superfície plana, rugosa com aspecto aveludado a membranoso. Micromorfologicamente apresentam-se como hifas septadas e hialinas e ramificações com conídios hialinos ou demáceos piriformes e dentículos no ápice, (Figura 1). LACAZ et al, 2002).

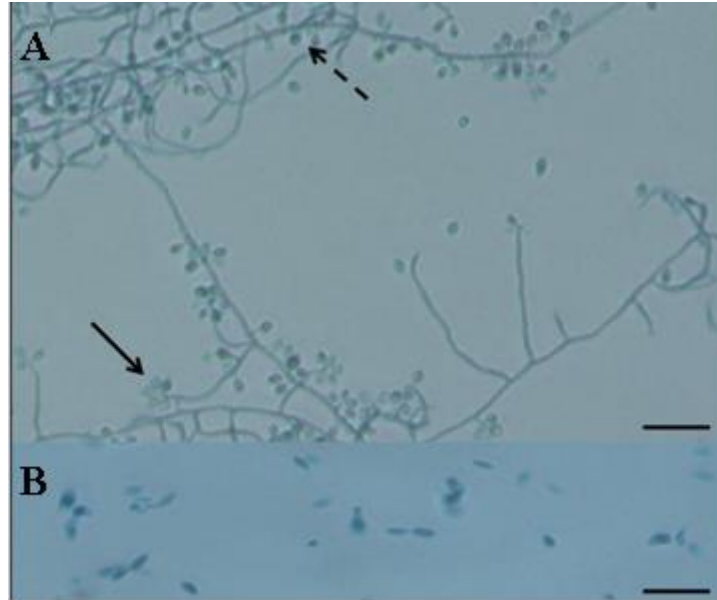
Figura 1: Morfologia de *Sporothrix* spp. (A): Colônia filamentosa após 21 dias de incubação cultivado em Agar Batata Dextrose a 25°C. (B): Colônias leveduriformes cultivado em Agar infusão de cérebro e coração após 10 dias de incubação a 36°C.



Fonte: Adaptado de FREITAS, 2014.

Ao serem cultivados em temperaturas mais elevadas, em torno de 37°C esses isolados apresentam colônias lisas de aspecto cremoso e de coloração creme, onde microscopicamente é possível observar células ovais e alongadas. (LOPES-BEZERRA, SCHUBACH, COSTA, 2006).

Figura 2: (A): Microcultivo da forma filamentosa corado com lactofenol azul de algodão (aumento de 400X). Seta contínua indica conidióforo simpodial e seta tracejada indica conídio demáceo. (B): Microscopia de células leveduriformes coradas com lactofenol azul de algodão apresentando brotamentos em forma de charuto (aumento de 400X). Barras: 10 µm.



Fonte: Adaptado de FREITAS, 2014.

2.3 Principais fatores de virulência

Fator de virulência é toda característica de um micro-organismo que permita ou aumente a sua capacidade de invasão e desenvolvimento no hospedeiro. (BARROS, 2017).

Assim como muitos micro-organismos, algumas espécies fúngicas deste complexo, possuem fatores de virulência. Apesar de haver poucos estudos sobre os fatores deste fungo, alguns já foram descritos como a termotolerância e a produção de melanina do *S. schenckii*. (FREITAS, 2014).

Os fatores de virulência atuam em conjunto e a inibição na expressão de apenas um desses fatores pode ser suficiente para inibir por completo o desenvolvimento da infecção. É importante ressaltar, ainda, que as espécies dentro do complexo *S. schenckii* podem apresentar potencial de virulência em maior ou

menor grau e, mesmo considerando uma única espécie, podemos observar diferenças consideráveis nesse aspecto (CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016).

Um dos fatores de virulência desse fungo é a termotolerância, proporcionando aos fungos desta espécie, a capacidade de suportar e crescer na temperatura corpórea dos hospedeiros endotérmicos. (FREITAS, 2014). Este fator de virulência está relacionado principalmente com as manifestações clínicas da esporotricose (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

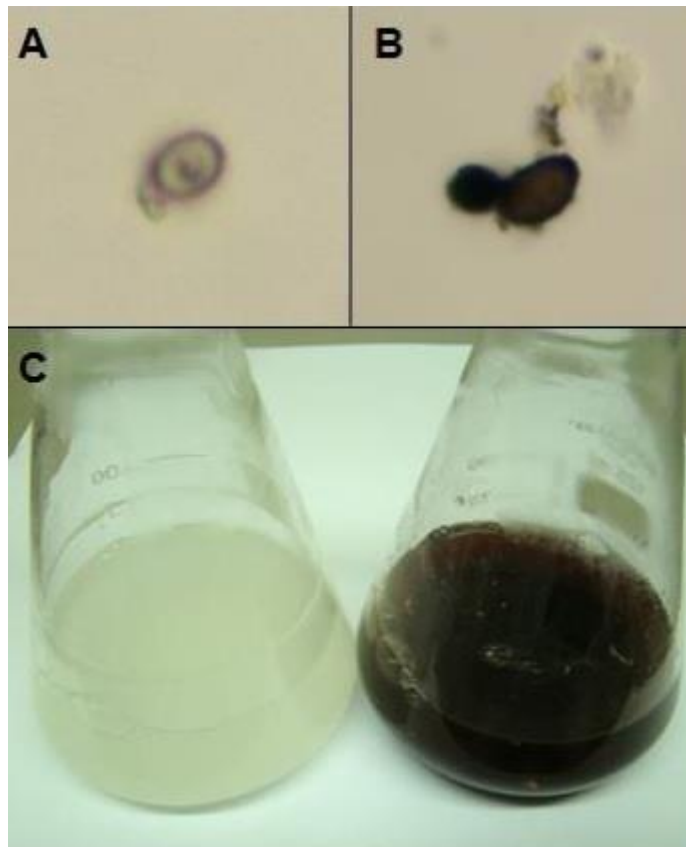
Os isolados do complexo *Sporothrix* que apresentam tolerância e crescimento a 37°C, são capazes de ocasionar esporotricose linfática, enquanto que as espécies que crescem a 35°C não o são. Outro importante fator de virulência é a glicoproteína de 70kDa, que é um dos componentes da parede celular do fungo, que realiza aderência ao epitélio aumentando o seu potencial invasivo. (FREITAS, 2014).

Melaninas são pigmentos ubíquos que atuam como fator de virulência e são produzidos por uma ampla gama de organismos vivos. O principal tipo de melanina encontrado dentro do Reino Fungi é a melanina 1,8-di-hidroxi naftaleno (DHN) (Figura 3 A). Esse tipo de melanina pode ser sintetizada sem a presença de um precursor no ambiente de crescimento dos fungos, uma vez que sua biossíntese começa com um produto de vias metabólicas celulares essenciais, como a glicólise e via das pentoses fosfato, diferente de outros tipos de melaninas fúngicas que são sintetizados apenas se um precursor específico estiver presente durante o crescimento do fungo. A L- tirosina é o precursor mais comum no processo de síntese de melanina fúngica, sendo este o precursor da eumelanina (Figura 3 B) e piomelanina (Figura 3 C). A melanina aumenta a resistência do fungo ao processo fagocitário induzindo escape fúngico das defesas do hospedeiro, sendo considerado também um fator de resistência contra alguns antifúngicos, como anfotericina, itraconazol e terbinafina. (OROFINO-COSTA, 2018).

Os perfis de virulência mudam dependendo do patógeno, características e defesas do hospedeiro. *S. brasiliensis* é a espécie mais virulenta, enquanto *S. schenckii* apresenta diferentes níveis de virulência, e *S. globosa* apresenta pouca ou nenhuma virulência. (OROFINO-COSTA, 2018). Segundo Almeida Paes et al., 2015, a espécie *S. brasiliensis* tem uma expressão maior da enzima urease comparada à espécie *S. schenckii*, que é considerada menos virulenta, sugerindo que a

expressiva concentração de urease esteja associada a maior patogenicidade da espécie *S. brasiliensis*.

Figura 3 -Três tipos distintos de melanina produzidos por *Sporothrix* spp. A) melanina DHN evidenciando o contorno de um conídio; B) eumelanina produzida por leveduras na presença de LDOPA e C) piomelanina produzida por leveduras em meio adicionado com L-tirosina à direita; o frasco à esquerda continha leveduras mortas e foi usado como controle.



Fonte: (Fotografias extraídas de Almeida-Paes, 2012)

2.4 Epidemiologia

A esporotricose tem distribuição cosmopolita, sendo mais frequente em países tropicais e subtropicais. Essa micose ficou durante muitos anos conhecida como a que acometia os jardineiros, uma vez que, esses micro-organismos são sapróbios do solo, e os jardineiros ao sofrerem algum trauma na pele ocasionado pelos vegetais contaminados se infectavam. (Figura 4) (CHAKRABARTI et al., 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017).

A micose apresenta um impacto significativo na saúde pública, levando as pessoas acometidas por ela a perdas de dias de trabalho e custos com saúde pública. Sem falar nas perdas pessoais e psicológicas ocasionadas pela doença. (BARROS,2010, SCHUBACH et al., 2010).

Entre 1941 e 1944 ocorreu o primeiro grande surto de esporotricose na África do Sul, no qual 2825 mineiros foram contaminados, devido à presença do fungo nas madeiras que serviam de escoras em uma mina de ouro no Transvaal. A umidade alta no local favoreceu a multiplicação e esporulação do fungo o que facilitou a contaminação dos mineiros. (Transvaal Mine Medical Officer's Association, 1947) (FINDLAY, 1970, citado por CRUZ, 2013). Atualmente, os casos mais frequentes no continente africano são na Nigéria, Sudão e Zimbábwe, onde há um sério problema no que diz respeito a diagnóstico e mapeamento dessa doença, devido à escassez de laboratórios de micologia nesses países. (CHAKRABARTI et al., 2015).

No início do verão de 1988 ocorreu o segundo grande surto de esporotricose, que teve início em trabalhadores de Nova York e Illions, que participavam de um programa de reflorestamento. Na ocasião foram confirmados 84 casos em 15 estados dos EUA, o que foi considerado a maior epidemia de esporotricose na história do país. (DIXON et al. 1991).

Entre os anos de 2007 e 2009, na região Nordeste da China, houve um aumento significativo no número de casos de esporotricose, onde há relatos na literatura de 457 casos humanos durante esse período. (FREITAS, 2014).

No Brasil, a esporotricose tem sido recorrente no sudeste brasileiro, sendo considerada uma região endêmica para a doença. (ALVES et al., 2010; BARROS et al., 2010).

O estado do Rio de Janeiro vem sofrendo com surtos de esporotricose há pelo menos 14 anos, onde as ocorrências deixaram de ser preferencialmente a ocupação profissional, mas estão bastante associadas a mordeduras e arranhaduras de felino e cães. (SILVA et al., 2012)

Em 2013, houve um estudo de análises filogenéticas, em que foi possível identificar elevada prevalência de *Sporothrix brasiliensis* nesses animais infectados (RODRIGUES et al., 2013).

De acordo com dados epidemiológicos da Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, entre os anos de 2013 a 2016, 3.377 casos suspeitos desta micose foram registrados, com elevada prevalência em pessoas do sexo feminino. Este estudo corrobora com o trabalho anterior realizado por Barros et al. 2010.

No estado do Rio Grande do Sul também há uma grande prevalência desta micose. Nos últimos anos foram diagnosticados vários casos de esporotricose em gatos domésticos e um aumento crescente da mesma em cães. (MADRID et al., 2007; MEINERZ et al., 2007).

Figura 4 - Prevalência mundial de esporotricose humana evidenciando a ampla distribuição da micose.



Fonte: Adaptado de Chakrabarti et al., 2015

Essa micose tem distribuição cosmopolita, aparecendo com maior frequência em regiões de clima tropical e temperado, com temperaturas entre 25 e 28°C, e umidade entre 80 a 95%. (BONIFAZ et al., 2007). Apesar do aumento no número de casos, a esporotricose é atualmente considerada uma doença negligenciada. (GUSMÃO, 2017).

2.5 Fisiopatogenia

O principal modo de infecção da esporotricose humana ocorre através da inoculação de estruturas fúngicas na pele, em decorrência de traumas sofridos, sendo rara a ocorrência através da via pulmonar devido à inalação de conídios (BARROS et al., 2011)

A inoculação vegetal ocorre por meio de pequenos traumas cutâneos causados por detritos de plantas contaminadas, mas a inoculação também pode ocorrer através de arranhadura ou mordedura de animais infectados pelo fungo, especialmente os felinos. (LOPES-BEZERRA, 2018).

Esse agente etiológico pode se alojar na derme e tecido subcutâneo, o que caracteriza a forma cutânea da doença, como também pode se espalhar pela via linfática desencadeando a forma cutâneo- linfática. E ainda, se disseminar pela corrente sanguínea resultando na forma disseminada da doença. (ABREU, 2017).

Após a inoculação do fungo no organismo o aparecimento das lesões pode variar entre 3 dias ou 12 semanas, contudo em alguns casos a cura é espontânea. (FREITAS, 2014)

2.6 Aspectos Clínicos

2.6.1 Forma cutânea fixa

É a forma da esporotricose caracterizada por uma lesão única ou múltiplas lesões ulceradas, que permanecem restritas ao local de inoculação. A verificação de múltiplas lesões está geralmente associada à traumas em diferentes localidades da pele no momento da exposição ao agente. (ABREU, 2017) Trata-se de uma lesão papulopostular, verrucosa e eritematosa (Figura 5) (BARROS et al., 2011; BONIFAZ,

2017). É a segunda forma mais comum e abrange cerca de 20% dos casos. Essa forma clínica é atribuída à uma prévia sensibilização do indivíduo ao *sporothrix spp.* geralmente em áreas endêmicas, o que proporciona um melhor controle imunológico do hospedeiro, com limitação da lesão. (FREITAS, 2014). Essa forma da esporotricose, por ter características clínicas semelhantes à outras doenças dermatológicas, dificulta o diagnóstico clínico. (ROLDÁN-MARÍN et al., 2009). A forma cutânea fixa da esporotricose, está relacionada à ausência de termotolerância pela cepa envolvida (ABREU, 2017).

Figura 5: Forma cutânea fixa da esporotricose



Fonte: Adaptado de Orofino-Costa et al., 2017

2.6.2 Forma Linfocutânea

A forma linfocutânea (Figura 6) é a forma mais comum da esporotricose, correspondendo a cerca de 75% dos casos (BARROS et al., 2011). Os primeiros sintomas dessa forma da doença podem surgir entre três semanas e seis meses após a infecção. As lesões geralmente estão localizadas entre os membros superiores e inferiores, iniciando -se com lesão única que geralmente é indolor. (CORDEIRO et al., 2011). Há a formação da pápula no local da inoculação, em seguida o desenvolvimento de um nódulo subcutâneo nos canais linfagíticos regionais, que em poucas semanas formam uma cadeia de nódulos linfáticos. (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Figura 6: Forma linfocutânea da esporotricose humana.



Fonte: Adaptado de Oliveira, 2014.

2.6.3 Forma cutânea disseminada

Essa é a forma da esporotricose em que ocorre a disseminação hematogênica do fungo. (FREITAS, 2014). Na forma disseminada há presença de múltiplas lesões nodulosas subcutâneas, esses nódulos flácidos com a evolução do quadro podem evoluir para nódulos papulosos ou úlceras. Essa forma clínica é rara, responsável por apenas 5% dos casos, e acomete principalmente pacientes imunocomprometidos. (FREITAS, 2014; RODRIGUES, 2010; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Figura 7: Esporotricose cutânea disseminada, paciente com lesões papulosas e pústulas, nódulos e ulcerações em toda face.



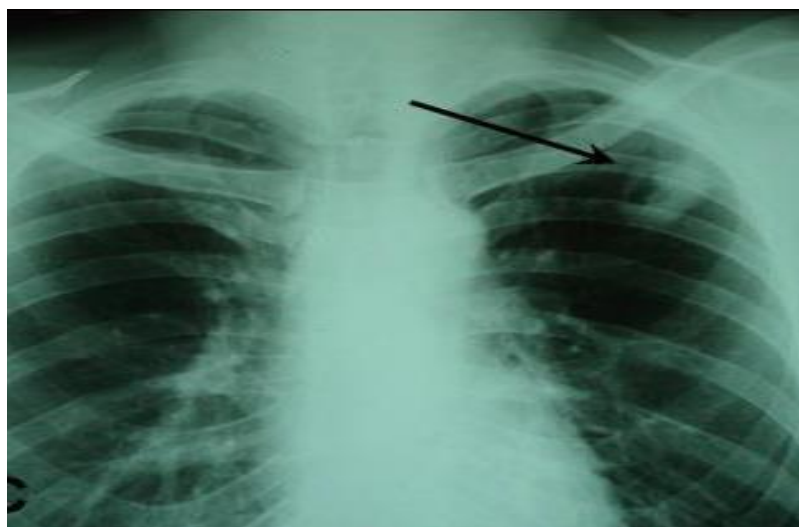
Fonte: Adaptado de Schechtman et al; 2011)

2.6.4 Forma Extracutânea

A forma extracutânea (Figura 8) pode ser adquirida pela via hematogênica, inoculação direta em regiões da mucosa ou através da inalação de esporos do seu agente etiológico, no entanto essa forma está mais associada a pacientes com a imunidade comprometida. Estão nesse grupo de risco pacientes portadores de HIV, pacientes que fazem uso de quimioterápicos, corticoides e terapia prolongada com antimicrobianos (FREITAS, 2014; OLIVEIRA, 2014; RAMOS-E-SILVA et al., 2007).

Boa parte dos pacientes acometidos pela forma extracutânea apresentam também lesões cutâneas. (LACAZ, 2002). Qualquer órgão ou tecido do corpo pode ser afetado pelo fungo. Quando a parte óssea é acometida, é desenvolvida a forma osteoarticular, cujas lesões têm grande potencial de destruição óssea. A infecção pulmonar pode ser sintomática ou assintomática. Quando sintomática, as manifestações clínicas podem ser similares às de outras micoses que acometem o pulmão, assim como também se assemelham com aos sintomas da tuberculose e sarcoidose. (FREITAS, 2014). As lesões nodulares, linfadenomegalia e doença cavitária podem ser observadas através de radiografias. (BARROS et al., 2011;)

Figura 8: Esporotricose pulmonar cujo a seta aponta para uma cavitação no pulmão esquerdo.



Fonte: Adaptado de Freitas, 2014.

2.7 Diagnóstico

A investigação com o intuito de diagnosticar a esporotricose é feita correlacionando aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. (BARROS et al., 2011).

2.7.1 Exame Direto

No exame microscópico direto, as amostras de espécimes clínicos de *Sporothrix spp.* podem ser tratadas usando hidróxido de potássio (KOH) a 10%, coloração de Gram ou Giemsa. (OLIVEIRA, 2014).

Nas análises feitas através deste exame, as estruturas fúngicas de *Sporothrix spp.* são dificilmente visualizadas, mas ocasionalmente é possível observar leveduras em forma de charutos ou arredondadas em esfregaços corados ao Giemsa. No entanto, o exame possui baixa sensibilidade, em torno de 5%, e essas formas podem ser facilmente confundidas com outros agentes fúngicos, o que torna o exame inconclusivo para o diagnóstico dessa micose. (ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al., 2011 BARROS et al., 2011).

2.7.2 Exame Histopatológico

Na observação microscópica de cortes histológicos obtidos através de biópsia das lesões, e corados pelo PAS, Grocott-Gomori (GMS), também é possível visualizar leveduras arredondadas ou em forma de charuto, podendo essas leveduras estarem livres ou no interior de macrófagos. Seu citoplasma e parede celular têm a capacidade de se retrair, dando a impressão de haver uma cápsula, lembrando o *Cryptococcus neoformans*, devido à essa semelhança com outras enfermidades infecciosas, esse exame torna-se inespecífico, fazendo-se necessário o isolamento do fungo através de cultura. (CRUZ, 2013 QUINTELLA et al., 2011, 2012,).

2.7.3 Exame Sorológico

Métodos sorológicos auxiliam no diagnóstico desta micose, apesar de não confirmar diagnóstico. De acordo com a literatura, imunofluorescência direta, imunodifusão dupla, fixação do complemento, aglutinação em partículas do látex e ELISA são as provas sorológicas mais usadas. (FREITAS, 2014).

O exame sorológico por ensaio imunoenzimático (ELISA) é usado para pesquisar anticorpos em casos de pacientes com lesão fechada ou com difícil obtenção da amostra clínica. O referido método apresenta algumas limitações como reação cruzada com alguns outros agentes infecciosos, casos de falso-positivo e o tempo de janela imunológica, em que o paciente, mesmo infectado, ainda não desencadeou uma resposta imune humoral completa e não produziu anticorpos para serem detectados pela técnica (MARTINEZ-ALVAREZ ET AL., 2012).

2.7.4 Diagnóstico Molecular

A detecção molecular do patógeno é muito mais prática e rápida do que a utilização de testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou sorológicos. (RODRIGUES, 2010). No entanto, poucos métodos moleculares têm sido utilizados para detectar ácido desoxiribonucleico (DNA) de fungos pertencentes ao complexo *sporothrix*. (OLIVEIRA, 2016). Essa metodologia tem como base a reação da polimerase em cadeia (PCR), que permite ampliação e o sequenciamento de genes das espécies, através de *primers* oligonucleotídeos baseados no gene quitina-sintetase 1 das espécies fúngicas do *S. schenckii*, a partir da biopsia dos pacientes. (ABREU, 2017).

A primeira PCR para a identificação de *Sporothrix spp.* foi descrita por Kano e colaboradores (2001). A princípio, baseados no gene codificador da CHS 1 (quitina sintase 1) foram desenhados e a PCR foi capaz de detectar 10 pg de fragmento de DNA genômico de *Sporothrix spp.* Posteriormente essa metodologia foi utilizada para o diagnóstico molecular da esporotricose (FREITAS, 2014).

Outros métodos moleculares vêm sendo relatados para ajudar na identificação e genotipagem de isolados deste complexo, como por exemplo, análises de fingerprinting com o iniciador T3B, que é um iniciador universal que amplifica uma região do RNA transportador, já que cada fungo do complexo *Sporothrix* tem essa região de tamanho diferente (OLIVEIRA et al., 2014).

2.7.5 Cultura

O isolamento do agente etiológico através da cultura, é uma ferramenta importante na identificação da espécie fúngica analisada, uma vez que, a mesma é essencial no diagnóstico definitivo da esporotricose. O cultivo do *Sporothrix spp.* pode ser feito em BHI, ASD ou Ágar Batata. MORIS- JONES, 2002; CRUZ, 2013)

A princípio o isolamento é feito em ASD, acrescido de antibiótico, ficando as amostras incubadas de 5 a 7 dias à 25° C. (CRUZ, 2013; LARSSON, 2011). Para observar o dimorfismo deste fungo, as amostras devem ser incubadas a 25°C e a 37°C, onde à 37°C, serão observadas colônias leveduriformes cremosas de coloração creme, e à 25°C colônias filamentosas de cor escura. (XAVIER et al., 2004).

Segundo a literatura, o microcultivo entre 10 e 14 dias, em meio CMA ou PDA a 25°C, permite a caracterização microscópica onde é possível observar conídios demáceos ou hialinos, e o formato característico que lembra o formato de uma margarida. (CRUZ, 2013; BARROS et al., 2011; LARSSON, 2011).

2.7.6 Identificação Fenotípica

A taxonomia em micologia fundamenta-se na análise de características morfológicas e fisiológicas para a classificação dos fungos. Diferentes testes laboratoriais morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são realizados para a caracterização fenotípica. (RODRIGUES,2010).

As espécies do complexo *Sporothrix* têm a capacidade de assimilar diferentes fontes de nitrogênio e carbono; como também apresentam variação na assimilação de açúcares. (ABREU, 2017).

As principais características fenotípicas para o reconhecimento dessas espécies são a morfologia dos conídios pigmentados sésseis, o crescimento a 30, 35 e 37 ° C e a assimilação de sacarose, rafinose e ribitol. (Quadro 1) (MARIMON et al.;2007).

Quadro 1: Principais diferenças morfológicas entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

Espécies	Conídios sésseis pigmentados	Colônias maiores que 50mm em PDA a 30°C por 21 dias	Crescimento a 37°	Teste de assimilação da sacarose	Teste de assimilação da rafinose
<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. luriei</i>	Não	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Sim	+	+
<i>S. albicans</i>	Não	Sim	Sim	+	-

Fonte: Adaptado de Marimon et al. (2007)

2.8 Tratamento

A escolha do antifúngico usado para a terapia da esporotricose, ocorre de acordo com a forma clínica da doença que se desenvolveu no paciente, a espécie *Sporothrix* e o estado imunológico do hospedeiro. Entre as drogas disponíveis no Brasil para o tratamento desta micose, estão o iodeto de potássio, itraconazol, a Anfotericina B e a terbinafina. (OROFINO-COSTA et al., 2017).

O iodeto de potássio é uma opção terapêutica no tratamento da forma cutânea da esporotricose humana, cujo o mecanismo de ação ainda é desconhecido. Há estudos na literatura que sugerem que este medicamento atue na resolução dos granulomas pelo aumento da proteólise, enquanto outros estudos sugerem que ele atue aumentando o processo fagocitário. (BARROS et al., 2011a; REIS et al., 2012). Apesar da sua eficácia produz muitos efeitos adversos como gosto metálico, náuseas e vômitos, além de ser um fármaco de difícil utilização, uma vez que se deve aumentar gradualmente a dose (de 5 até 40 gotas) para ser bem

tolerado e ser administrado três vezes ao dia com água ou, preferencialmente, suco ou leite. (FREITAS, 2014).

O itraconazol é um derivado azólico que inibe a síntese do ergosterol na membrana fúngica, ao interagir com enzimas do citocromo P450, interferindo diretamente na permeabilidade deste micro-organismo. (FREITAS, 2014). Por ser bem tolerado e apresentar menos efeitos colaterais que o iodeto de potássio, tal fármaco tem sido considerado uma opção mais segura no tratamento da esporotricose cutânea sendo a dose recomendada entre 100 a 200 mg por dia. (BARROS et al., 2004, 2011a, 2011b; KAUFFMAN et al., 2007 FREITAS, 2014). Apesar do itraconazol ter surgido como uma opção de tratamento com menos efeitos colaterais para o tratamento da esporotricose cutânea e linfocutânea, estudos mostraram que casos de resistência *in vitro* a este fármaco veem aumentando, se tornando cada vez mais recorrente. (NOBRE et al., 2002;).

A terbinafina é uma alternativa medicamentosa para as formas cutâneas da esporotricose que tem demonstrado boa eficácia no tratamento dos pacientes. Este fármaco é um derivado alilamina que atua bloqueando a síntese do ergosterol pela inibição da enzima esqualeno epoxidase. É administrada por via oral, apresentando eficácia na dose de 250 mg/dia, através da inibição da síntese do ergosterol pela esqualeno-epoxidase (FREITAS, 2014; ABREU, 2017)

O fluconazol apesar de ter uma menor eficácia no tratamento da esporotricose em relação ao itraconazol, é usado como alternativa terapêutica em casos de intolerância ao itraconazol, ou em casos de interação medicamentosa do itraconazol com outro medicamento. (OLIVEIRA, 2016).

A anfotericina B é um antimicrobiano de amplo espectro, considerado o medicamento de escolha para os casos de acometimento graves da esporotricose. Esse fungicida atua ligando-se ao ergosterol que é o principal esterol na membrana do micro-organismo, ocasionando a formação de poros, e consequentemente alteração na permeabilidade seletiva desta membrana, resultando no efluxo de K⁺, inibição da glicólise e efluxo de Mg²⁺ e influxo de prótons, resultando no efeito fungicida deste fármaco. É utilizado em infusão intravenosa na dose de 0,25 a 1 mg/kg/dia com dose cumulativa de 2 a 4 gramas, conforme a resposta clínica. (ABREU; 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de sensibilidade antifúngica das cepas do complexo *Sporothrix schenckii* coletadas em um Hospital Universitário em João Pessoa – PB.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima dos antifúngicos testados frente as cepas do complexo *Sporothrix schenckii*;
- Correlacionar os perfis de sensibilidade com as espécies previamente identificadas;
- Destacar a importância dos testes de susceptibilidade para orientação no tratamento dos pacientes com esporotricose.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de caráter experimental com abordagem quantitativa.

4.2 Local do estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba. Os dados utilizados foram adquiridos do banco de dados do setor de micologia (SM), da Unidade Laboratório de Análises Clínicas (ULAC), do HULW-EBSERH.

4.3 Critérios de inclusão

Cepas positivas de *Sporothrix spp.* coletadas e isoladas no SM ULAC do HULW-EBSERH, no período entre Janeiro de 2016 a Dezembro de 2017.

4.4 Critérios de exclusão

Todos os casos negativos para esporotricose, no período de Janeiro de 2016 a Dezembro de 2017 no SM ULAC do HULW-EBSERH.

4.5 População e amostra

Foram utilizadas 24 cepas isoladas de 24 pacientes atendidos pelo SM-ULAC do HULW-EBSERH, previamente identificadas fenotipicamente no laboratório de micologia, como descrito no quadro a seguir. A classificação das espécies do complexo *S. schenckii* foi feita através de um estudo realizado em 2018 por FERREIRA, J. S et al, que teve como base a chave taxonômica desenvolvida por Rodrigues, A. M. (2010).

Quadro 2: Identificação das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

Código de Referência das cepas	Espécie	Forma Clínica
467	<i>S. brasiliensis</i>	Linfocutânea
680	<i>S. brasiliensis</i>	Cutânea Fixa
568	<i>S. brasiliensis</i>	Linfoncutânea
682	<i>S. brasiliensis</i>	Linfocutânea
707	<i>S. brasiliensis</i>	Cutânea Fixa
738	<i>S. brasiliensis</i>	Linfocutânea
101	<i>S. schenckii</i>	Linfocutânea
547	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa
22	<i>S. . schenckii</i>	Linfoncutânea
571	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa
37	<i>S. . schenckii</i>	Cutânea Fixa
44	<i>S. . schenckii</i>	Linfoncutânea
695	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa
702	<i>S. schenckii</i>	Linfoncutânea
55	<i>S. . schenckii</i>	Cutânea Fixa
76	<i>S. . schenckii</i>	Cutânea Fixa
751	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa
769	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa
776	<i>S. schenckii</i>	Linfoncutânea
780	<i>S. schenckii</i>	Linfoncutânea
781	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa
797	<i>S. schenckii</i>	Linfoncutânea
809	<i>S. schenckii</i>	Linfoncutânea
Heriton	<i>S. schenckii</i>	Cutânea Fixa

Fonte: Adaptado FERREIRA, J. S et al, 2018

4.6 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley e obedecendo aos aspectos éticos do Conselho Nacional de Saúde foi assegurado o anonimato dos indivíduos que participaram da pesquisa. Foi pedida a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) recomendado pela Resolução Nº466/2012 do CNS/MS que regulamenta a ética da pesquisa envolvendo seres humanos, pois o estudo é de caráter exploratório, sem a participação direta dos pacientes, utilizando apenas os dados arquivados SM-ULAC, do HULW-EBSERH. O projeto foi aceito por meio do registro de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética, de número 88846018.2.0000.5183.

4.7 Procedimentos Experimentais

A atividade antifúngica dos medicamentos testados, foram avaliadas pelo método de determinação da CIM, conforme procedimentos relatados na CLSI M38.

4.7.1 Preparação do inóculo

As cepas do complexo *S. schenckii* foram cultivadas em ágar batata dextrose por um período de 10 dias, a 35°C. Após esse período as colônias foram cobertas com cerca de 3mL de solução salina estéril a 0,85% com o auxílio de uma pipeta de transferência. Foi então preparada uma suspensão, agitando suavemente as colônias com o auxílio de uma alça. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas, foi então, filtrada com gaze estéril e transferida para um tubo de ensaio estéril, onde foi aguardado de 3 a 5 minutos até que as partículas mais pesadas da suspensão se depositassem no fundo do tubo. Em seguida a parte superior da suspensão foi transferida para outro tubo estéril, que foi devidamente fechado, homogeneizado e colocado em um agitador de tubos por cerca de 15 segundos. As densidades da suspensão de conídios foram lidas e ajustadas para uma densidade óptica de 0,9 a 0,11 numa transmitância de 80% a 82%. Só então as suspensões foram diluídas 1:50 no meio padrão (RPMI). As diluições de inóculo nas proporções de 1:50 200 µL do inóculo e 9800 µL de RPMI. O inóculo do teste de

sensibilidade foi produzido em quantidade suficiente para inocular cada poço de uma placa de microdiluição com 100 µL da suspensão diluída.

Para quantificar o inóculo foi colocado 10 µL de uma diluição de 1:100 do inóculo ajustado numa placa de ágar Sabouraud - dextrose para determinar o número viável de UFC por mL. As placas foram incubadas a temperatura de 28°C a 30 °C e observadas todos os dias para verificar a presença de colônias de fungos.

4.7.2 Preparação dos Antifúngicos

- **Pesagem dos antifúngicos**

Para determinar a quantidade de antifúngico ou diluente necessários para preparar a solução mãe, foram utilizadas as seguintes equações:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência de Ensaio (}\mu\text{g/mg)}} \quad (1)$$

ou

$$\text{Vol (mL)} = \frac{\text{Peso (mg)} \times \text{Potência de Ensaio (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentração (}\mu\text{g/mL)}} \quad (2)$$

Os antifúngicos utilizados nesse estudo (anfotericina B, fluconazol, voriconazol e itraconazol) foram pesados dentro de um eppendorf estéril, em uma balança analítica devidamente calibrada. Conforme a recomendação da CLSI, foi pesada uma quantidade em excesso de cada um dos antifúngicos. Após a pesagem dos pós antifúngicos utilizou-se a equação 2 para determinar a quantidade de diluente a ser medida.

Para dissolver os antifúngicos utilizados neste trabalho, foi utilizado o dimetil sulfoxido (DMSO), com exceção do fluconazol que foi diluído em água. As soluções padrões dos antifúngicos foram preparadas em concentrações variadas, com base nas faixas de concentrações relevantes para o estudo disponíveis na CSLI.

- **Preparação das diluições dos agentes antifúngicos:**

Foram realizadas 10 diluições seriadas decrescentes dos antifúngicos deste estudo, a partir da solução mãe. Para preparar volumes de 5 mL de cada antifúngico diluído, foi pipetado 4,9mL do meio RPMI-1640 e colocado em tubos de ensaio estéril, totalizando 10 tubos. Em cada um desses tubos foi acrescentado 0,1 mL de cada diluição dos antifúngicos a serem testadas. Foi utilizado o meio RPMI-1640, por ser o meio padronizado pela CLSI para ensaios com fungos filamentosos. A faixa testada para a anfotericina B, voriconazol e itraconazol foi entre 16 µg/mL a 0,03 µg/mL e para o fluconazol variou entre 64 µg/mL a 0,125 µg/mL.

4.7.3 Método de Determinação da CIM -CLSI M38A

Os testes foram realizados em placas de microdiluição, em duplicata e em ordem decrescente de concentração das soluções antifúngicas, do poço 1 ao 10, sendo o poço 11 o controle positivo (100µL do inóculo diluído), e o 12 o controle negativo (100µL do meio RPMI). Todas as placas testes foram incubadas a temperatura ambiente por um período de 3 dias para posterior leitura. A CIM para os antifúngicos submetidos ao teste foi definida como a menor concentração do antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento fúngico em relação ao controle (anfotericina B e Itraconazol), e uma inibição que corresponde a uma redução de aproximadamente 50% (metade ou mais) no crescimento, comparado com o controle para os derivados azólicos. O crescimento em cada poço de CIM foi comparado com o do controle de crescimento com o auxílio de um espelho de leitura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea que vem sendo relatada em todo o mundo, contudo a incidência do seu agente etiológico varia de acordo com sua distribuição geográfica. (ROJAS, et al.; 2018). Estudos sobre o perfil de sensibilidade antifúngica do complexo *Sporothrix schenckii*, ainda são escassos o que dificulta o tratamento da esporotricose. Conhecer as espécies mais prevalentes de cada região e submetê-las a testes de sensibilidade antifúngica é de grande importância para a garantia de um tratamento adequado.

No presente estudo foram utilizadas 24 cepas provenientes do trabalho de caracterização fenotípica de isolados do complexo *Sporothrix schenckii* realizado por FERREIRA, J. S., (2018), cujas cepas foram coletas SM ULAC do HULW. Destas, 16 cepas foram provenientes de pacientes do sexo feminino e 8 do sexo masculino. No que diz respeito a forma clínica da doença, 13 casos foram da forma linfocutânea o que corresponde a 54,2% e 11 casos da forma cutânea fixa ou localizada correspondendo a 45,8% dos casos.

No presente estudo avaliou-se o perfil de suscetibilidade antifúngica das 24 cepas clínicas isoladas de pacientes atendidos no HULW e previamente identificados por FERREIRA et al.,(2018) (tabela 1).

Código de Referência	Espécie	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)			
		Anfotericina B	Fluconazol	Voriconazol	Itraconazol
467	<i>S. brasiliensis</i>	4 µg/mL	> 64µg/mL	2µg/mL	12µg/mL
680	<i>S. brasiliensis</i>	0,5 µg/mL	>64µg/mL	0,5µg/mL	16 µg/mL
568	<i>S. brasiliensis</i>	2 µg/mL	>64µg/mL	4 µg/mL	>16 µg/mL
682	<i>S. brasiliensis</i>	4 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	8 µg/mL
707	<i>S. brasiliensis</i>	0,125 µg/mL	>64µg/mL	0,125 µg/mL	16 µg/mL
738	<i>S. brasiliensis</i>	>16 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	>16 µg/mL
76	<i>S. schenckii</i>	2 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL
101	<i>S. schenckii</i>	8 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL
695	<i>S. schenckii</i>	4 µg/mL	>64µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL
547	<i>S. schenckii</i>	2 µg/mL	>64µg/mL	8 µg/mL	>16 µg/mL
809	<i>S. schenckii</i>	1 µg/mL	>64µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL
571	<i>S. schenckii</i>	1 6µg/mL	>64µg/mL	0,25 µg/mL	9 µg/mL
22	<i>S. schenckii</i>	2 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL
702	<i>S. schenckii</i>	>16 µg/mL	>64µg/mL	0,5 µg/mL	>16 µg/mL
37	<i>S. schenckii</i>	2 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	16 µg/mL
44	<i>S. schenckii</i>	4 µg/mL	>64µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL
751	<i>S. schenckii</i>	0,5 µg/mL	>64µg/mL	0,5 µg/mL	8 µg/mL
769	<i>S. schenckii</i>	1 µg/mL	>64µg/mL	1 µg/mL	4 µg/mL
776	<i>S. schenckii</i>	0,25 µg/mL	>64µg/mL	0,5 µg/mL	4 µg/mL
780	<i>S. schenckii</i>	1 µg/mL	>64µg/mL	4 µg/mL	4 µg/mL
781	<i>S. schenckii</i>	1 µg/mL	>64µg/mL	2 µg/mL	8 µg/mL
797	<i>S. schenckii</i>	0,25 µg/mL	>64µg/mL	0,38 µg/mL	2 µg/mL
55	<i>S. schenckii</i>	4 µg/mL	>64µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL
Heriton	<i>S. schenckii</i>	4 µg/mL	>64µg/mL	4 µg/mL	8 µg/mL
Controle (+)		+	+	+	+
Controle (-)		-	-	-	-

Tabela 1: Média das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antifúngicos testados

+ = crescimento fúngico

- = não crescimento fúngico

Fonte: Dados da pesquisa, 2018

Entre os antifúngicos largamente utilizados no tratamento da esporotricose estão os derivados azólicos, particularmente o itraconazol, como fármacos de primeira escolha para as formas subcutâneas da doença, e a anfotericina B para as formas disseminadas da esporotricose. (ABREU, 2017). Apesar de não haver relatos clínicos do voriconazol na terapêutica da doença, este foi utilizado neste estudo por apresentar estrutura molecular semelhante ao fluconazol (utilizado no tratamento da esporotricose).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1, o VRZ apresentou os melhores resultados, pois todas as cepas testadas apresentaram-se susceptíveis a este antifúngico, tendo os intervalos da CIM variando entre 8 µg/mL a 0,125.

Estes resultados divergem de outros trabalhos que observaram *Sporothrix spp.* com menor susceptibilidade a ação do VRZ, como demonstra os trabalhos realizados por MARIMON et al., 2007; MAHMOUND et al., 2016; ABREU, 2017.

A CIM da Anf. B variou entre 0,125 µg/mL a 16 µg/mL para a grande maioria das cepas, no entanto duas não se mostraram susceptíveis pois apresentaram CIM superior a 16 µg/mL. Os resultados encontrados por MAHMOUND et al., 2016 também apresentaram uma ampla faixa de CIM para Anf B, variando de 1 µg/mL a 16 µg/mL para as formas levedureiformes, e 1 µg/mL a 8 µg/mL para forma micelial de todos os isolados testados, entre eles *S. schenckii*. Em outro estudo realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2009), a Anf B também apresentou boa atividade antifúngica para cepas do complexo *Sporothrix*.

O perfil de sensibilidade antifúngica realizado por Silveira et al., (2009), apresentou um amplo intervalo da CIM para a Anf B (0,03 mgL⁻¹ a 16,0 mgL⁻¹), o que corrobora com o presente estudo. A resistência a anfotericina B parece estar diretamente ligada a alterações qualitativas e quantitativas no ergosterol presente na membrana fúngica, no entanto, estudos já identificaram cepas resistentes, sem que essas tenham apresentado alterações na quantidade de ergosterol na membrana fúngica, o que sugere, que outros mecanismos podem estar associados à resistência aos antifúngicos poliênicos. (BARROS, 2017).

O itraconazol não apresentou a mesma efetividade inibitória que o voriconazol e a anfotericina B, apresentando CIM >16 µg/mL a 5 das 24 cepas testadas, sendo três *S. brasiliensis* (568,707,738) e duas *S. schenckii* (547,702), com

intervalos de CIM entre 2 µg/mL - 16µg/mL, o que diverge dos resultados encontrados por Marimon et al.; (2007), que mostrou atividade do ITZ às cepas *S. brasiliensis* testadas, enquanto que, para as outras espécies testadas, este antifúngico apresentou altas CIMs. Os resultados encontrados por Stopiglia e colaboradores (2013), com isolados do complexo *Sporothrix schenckii*, apresentou intervalos de CIM entre 16 µg/mL a 0,03 µg/mL, mostrando um intervalo maior de CIM, do que o observado no presente trabalho, como também faixas de CIM menores.

MAHMOUDI et al.; (2016), revelou também boa atividade do ITZ contra isolados de *S. schenckii*. Segundo a CLSI M38-A, valores de CIM do itraconazol >8µg/mL estão associados com resistência clínica, quando as CIMs são determinadas após 48 horas de incubação. Em um estudo realizado por VETTORATO R. et al., (2017), foi relatado um caso de esporotricose linfocutânea no membro superior direito, cujo o fungo foi identificado como *S. schenckii*. O paciente iniciou tratamento com itraconazol (200 mg / dia), mas a sensibilidade antifúngica *in vitro* demonstrou alta resistência a este antifúngico e as lesões não regrediram com o tratamento. Segundo MEINERZ et al.;(2007), os casos de pacientes que apresentam resistência ao itraconazol, podem estar relacionados ao seu uso indiscriminado, levando consequentemente a possíveis falhas na terapia com este fármaco.

O fluconazol não demonstrou susceptibilidade contra nenhum dos isolados em nenhuma das concentrações testadas, mostrando ter valores de CIM superiores a 64 µg/mL. A baixa atividade *in vitro* do fluconazol, já havia sido demonstrada em estudos anteriores (ROJAS, 2018; ABREU 2017; STOPIGLIA et al.; 2013). MAHMOUDI et al.; (2016), mostraram que o FLC também apresentou CIM >64 µg/mL, o que corrobora com o presente trabalho. SCORDINO et al, (2015) observaram em seus resultados que todas as cepas do complexo *S. schenckii* não apresentaram susceptibilidade ao fluconazol. Em outro estudo realizado por MARIMON et al.; (2007), esse fármaco mostrou ter valores de CIM de 128 µg/mL para cinco espécies do complexo *S. schenckii*, entre elas *S. brasiliensis* e *S. schenckii*.

Correlacionando os perfis de sensibilidade com as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* foi observado que 50% da espécie *S. brasiliensis* não foram

susceptíveis algum dos antifúngicos testados, enquanto que a espécie *S. schenckii* apresentou 11,1% de cepas que não apresentaram susceptibilidade.

Os casos de resistência *in vitro* aos antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose, veem se tornando cada vez mais recorrentes como já foi relatado em estudos anteriores (SCORDINO et al, 2015; ROJAS, 2018; MEINERZ et al.,2007 NOBRE 2002;). Por essa razão, conhecer o perfil de susceptibilidade desses antifúngicos é importante para minimizar erros na farmacoterapia.

6 CONCLUSÃO

- Observou-se uma diferença na suscetibilidade antifúngica entre as espécies *S. brasiliensis* e *S. schenckii*;
- Verificou-se um amplo intervalo de CIM para a anfotericina B, indicando que a suscetibilidade antifúngica varia de cepa;
- O itraconazol apresentou elevadas CIMs, com intervalos entre 16 µg/mL e 2 µg/mL, demonstrando CIMs maiores que o voriconazol e anfotericina B;
- O voriconazol apresentou intervalos da CIM entre 8 µg/mL a 0,125 µg/ml, mostrando que todas as cepas testadas demonstrando possível sensibilidade ao antifúngico;
- A ampla resistência *in vitro* ao fluconazol em isolados clínicos do complexo *Sporothrix schenckii* sugere uma possível resistência intrínseca a este fármaco;
- O conhecimento do perfil de sensibilidade das espécies a esses antifúngicos, podem ajudar a minimizar erros de esquemas terapêuticos, auxiliando na melhora da farmacoterapia do paciente.

REFERÊNCIAS

ABREU, D. P. B. **Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos de cães e gatos pertencentes ao Complexo *Sporothrix schenckii* oriundos do estado do Rio de Janeiro**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, L.C.; OLIVEIRA, M.M.E.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; NOSANCHUK, J.D. and ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. Phenotypic Characteristics Associated with Virulence of Clinical Isolates from the *Sporothrix* Complex. **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 212308, 10 pages, 2015.

BARROS, M. B. L; PAES, R. A; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin. Microbiol.** v. 24, n. 4, p.633-654, 2011.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.P.; COLL, J.O.; GREMIAO, I.D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A.O. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Rev. Panam. de Salud Pública**, v.27, p. 455-460, 2010.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SANCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. *J. Fungi*. v. 3 (1): 6. Mar, 2017.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; MOCHIZUKI, T. and LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CLAVIJO-GIRALDO, D. M.; MATÍNEZ-ALVAREZ, J. A.; LOPES-BEZERRA, L. M.; PONCE-NOYOLA, P.; FRANCO, B.; ALMEIDA, R. S.; MORA-MONTES, H. M. Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 122, p. 73-77, 2016.

CORDEIRO, F. N.; PAULA, C. D. R.; BRUNO, C. B.; MOTTA, J. O. C. Orientação familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 121-124, 2011.

CRUZ, L.C.H.. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Vet e Zootec.**, v.20, p. 08-28, 2013.

DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E. et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **J. Clin. Microbio.**, v. 29, p.1106-1013, 1991.

FREITAS, D. F. S. **Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos , clínicos e terapêuticos associados à esporotricose**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) 164f.- INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, Fev. 2014.

GUSMÃO, B. S. Esporotricose felina, uma doença emergente de risco a saúde pública: Aspectos clínicos-epidemiológicos. **Rev. Cien. Med. Vet**, v. 28, p. 1-7, Jan. 2017.

KAUFFMAN, C. A., HAJJEH, R., CHAPMAN, S. W. Guidelines for the Management of Patients with Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 30, p. 684–687, 2007.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica. **Sarvier**, V. 44, n. 5, 2002.

LARSSON, C.E. Esporotricose. **Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.**, São Paulo. v. 48, p. 250-259, 2011.

LOPES-BEZERRA, L.M.; MORA-MONTES H.M.; ZHANG, Y.; NINO-VEGA, G.; RODRIGUES, A.M.; CAMARGO, Z.P.; HOOG, S. **Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents**. *Medical Mycology*, 56, S126–S143, 2018.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O.. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 78(2), p.293-308, 2006.

MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; CARAPETO, L. P.; ANTUNES, T. A.; SANTOS JR, R.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose óssea e cutânea em um canino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 441-443, 2007.

MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Sucetibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. / In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, pág. 60-2, jan.-fev. 2007.

MORIS-JONES, R. Sporotrichosis. *Clinical and Experimental Dermatology*. v. 27, p. 427-431, 2002

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; CAETANO, D.T.; FAÉ, F.; CORDEIRO, J. M.C.; MEIRELES, R.M.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brazil) e revisão de literatura brasileira. *Revista brasileira de Ciências Veterinárias*. v. 9, n.1, p.36-41, 2002.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em micologia médica**. 4ª edição. Rio de Janeiro, 2014.

OROFINO-COSTA, R.; RODRIGUES, A.M.; MACEDO, P.M.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 606-620, Oct. 2017.

PAPPAS, P. G.; TELEZ, I.; DEEP, A. E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 65-70, 2000.

QUINTELLA, L.P, Passos SR, do Vale AC, Galhardo MC, Barros MB, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of cutaneous pathology**, v. 38, n.1, p. 25-32, 2011.

QUINTELLA L.P, Passos SR, de Miranda LH, Cuzzi T, Barros MB, Francesconi-do-Vale AC, et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. **British Journal of Dermatology**; v.167, n.4, p. 837-846, 2012.

REIS, E.G.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; ROCHA, R.F.; CASTRO, V.S.,; BARROS, M.B.; et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **J Feline Med Surg** v.14(6): 399-404. 2012.

RODRIGUES, A. M. **Polyphasic taxonomy and proteomic features in the *Sporothrix schenckii* complex**. 2010. 241 p. Dissertation (Master) – Federal University of São Paulo, São Paulo, 2010.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Med. Mycology**. v. 51, issue 4, p. 405-412, May, 2013.

ROLDÁN-MARÍN, R., CONTRERAS-RUIZ, J., ARENAS, R., VAZQUEZ-DELMERCADO, E., TOUSSAINT-CAIRE, S. & VEGA-MEMIJE, M. E. Fixed sporotrichosis as a cause of a chronic ulcer on the knee. *International Wound Journal*. (6)1: 63-66, 2009.

SCORDINO, F. et al. Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. **J. Biol. Research**, Italy. V. 88, p. 139-140. Janeiro, 2015.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. *Bull. Johns Hopkins Hospital*. 9: 286-290. 1898.

SILVA, ET al.. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 28 (10), p: 1867-1880, Out, 2012.

VERMA, S. et al. Sporotrichosis in sub-himalayan india. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. 1–5, 2012.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA RM, ALMEIDA-PAES R, OLIVEIRA M M E, FREITAS DFS, GUTIERREZA GALHARDO MC. New diagnostic applications in sporotrichosis. **Skin biopsy perspectives**. p. 53-72, 2011.